



**Universidad**  
Zaragoza



Facultad de Veterinaria  
**Universidad** Zaragoza

# Trabajo de Fin de Grado

Estudio del perfil lipídico en función del tipo  
de proteína dietética en ratones carentes de  
*ApoE*



Study of the lipid profile depending on  
the type of dietary protein in mice lacking  
*ApoE*

Autor

María Barco Campos

Directores

M.A. Navarro Ferrando

Javier Sánchez Marco

Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Grado en Biotecnología – Curso 2019/2020

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	1
<b>2. ABSTRACT</b>	1
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>3.1 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y ATROSCLOSOSIS</b>	2
<b>3.2 METABOLISMO LIPOPROTEICO</b>	2
<b>3.3 APOLIPOPROTEÍNA AI Y HDL EN ATROSCLOSOSIS</b>	3
<b>3.4 APOLIPOPROTEÍNA E</b>	4
3.4.1 RATÓN CARENTE DE <i>APOE</i> COMO MODELO DE EXPERIMENTACIÓN	5
<b>3.5 PAPEL DE LAS FUENTES PROTEICAS EN EL DESARROLLO DE LA ATROSCLOSOSIS</b>	5
<b>4. OBJETIVOS</b>	6
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	6
<b>5.1 MATERIAL BIOLÓGICO</b>	6
<b>5.2 PARÁMETROS PLASMÁTICOS</b>	7
5.2.1 DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS (TAG) TOTALES EN PLASMA	7
5.2.2 CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA EN PLASMA	8
5.2.3 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS (NEFA)	8
5.2.4 DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL EN PLASMA	9
5.2.5 SEPARACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE FILTRACIÓN POR GEL (FPLC)	9
<b>5.2.5.1 DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL</b>	10
<b>5.2.5.2 DETERMINACIÓN DEL COLESTEROL LIBRE Y ESTERIFICADO</b>	11
5.2.6 DETERMINACIÓN DE APOLIPOPROTEÍNAS MEDIANTE ELISA	11
<b>5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	12
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	12
<b>6.1 HEMBRAS</b>	12
6.1.1 DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS (TAG) TOTALES EN PLASMA	12
6.1.2 CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA EN PLASMA	13
6.1.3 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS (NEFA)	13
6.1.4 DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL EN PLASMA	14
6.1.5 SEPARACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE FILTRACIÓN POR GEL (FPLC)	14
<b>6.1.5.1 DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL</b>	15
<b>6.1.5.2 DETERMINACIÓN DEL COLESTEROL LIBRE Y ESTERIFICADO</b>	16
6.1.6 DETERMINACIÓN DE APOLIPOPROTEÍNAS MEDIANTE ELISA	17
<b>6.2 MACHOS</b>	17

6.2.1 DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS (TAG) TOTALES EN PLASMA.....	17
6.2.2 CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA EN PLASMA .....	18
6.2.3 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS (NEFA).....	18
6.2.4 DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL EN PLASMA.....	19
6.2.5 SEPARACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE FILTRACIÓN POR GEL (FPLC) .....	19
<b>6.2.5.1</b> DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL .....	20
<b>6.2.5.2</b> DETERMINACIÓN DEL COLESTEROL LIBRE Y ESTERIFICADO .....	21
6.2.6 DETERMINACIÓN DE APOLIPOPROTEÍNAS MEDIANTE ELISA .....	22
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	22
<b>8. CONCLUSIONS</b> .....	23
<b>9. REFERENCIAS</b> .....	23

## 1. RESUMEN

La aterosclerosis es una enfermedad crónica, generalizada y progresiva que afecta en mayor lugar a las arterias de mediano y gran tamaño. Se trata de un proceso multifactorial de desarrollo progresivo y lento, lo que incita a investigar sobre el freno o inhibición de la misma en modelos animales, provocado por factores genéticos y ambientales. Los ratones carentes de la apolipoproteína E (ApoE) son el modelo experimental utilizado para estudios relacionados con esta patología, ya que desarrollan la enfermedad de una forma acelerada.

Diversos estudios han demostrado que modular el contenido y tipo de macronutrientes en la dieta como azúcares o lípidos, influye en el desarrollo de la aterosclerosis. Sin embargo, el papel de las fuentes proteicas en el desarrollo de la misma es un campo poco explorado, por ello, en este proyecto se propuso analizar el perfil lipídico y lipoproteico de un grupo de 100 ratones, de ambos sexos, divididos en cuatro grupos en base al tipo de proteína ingerida en cada caso: caseína, soja, pollo y pavo. Tras 12 semanas de dieta, se llevó a cabo el análisis de algunos parámetros plasmáticos relacionados con la aterosclerosis tales como triglicéridos, glucosa, colesterol, ácidos grasos no esterificados y la apolipoproteína ApoA-I, además del análisis de las lipoproteínas del plasma.

Se observó un comportamiento diferencial en función del sexo, en los machos la ingesta de soja produce un aumento de glucosa, colesterol, triglicéridos y ApoA-I plasmáticos. Mientras que en las hembras es la ingesta de pavo la que produce un aumento de glucosa plasmática, si lo comparamos con la ingesta de caseína, es la dieta de ésta la que produce un aumento de triglicéridos plasmáticos y no existe cambio aparente en cuanto ApoA-I entre las diversas dietas. En cuanto al perfil libre/esterificado del colesterol asociado a lipoproteínas, en machos todas las proteínas ingeridas predisponen una mayor asociación de colesterol libre a las mismas, mientras que, en hembras, las dietas de soja y caseína poseen una mayor asociación de colesterol esterificado a VLDL y LDL.

## 2. ABSTRACT

Atherosclerosis is a chronic, generalized, and progressive disease that most affects the medium and large arteries. It is a multifactorial process of progressive and slow development, which encourages research on the brake or its inhibition in animal models, caused by genetic and environmental factors. Mice lacking apolipoprotein E (ApoE) are the experimental model used for studies related to this pathology, due to they develop the disease in an accelerated way.

Several studies have shown that modulating the content and type of macronutrients in the diet, such as carbohydrates or lipids, can influence its development. However, the role of protein sources in the evolution of atherosclerosis is a little explored field, therefore, in this project it was proposed to analyse the lipid and lipoprotein profile of a group of 100 mice, of both sexes, divided into four groups based on the type of protein ingested in each case: casein, soy, chicken and turkey. After 12 weeks of diet, the analysis of some plasma parameters related to atherosclerosis like triglycerides, glucose, cholesterol, non-esterified fatty acids and apolipoprotein ApoA-I was carried out, in addition to the analysis of plasma lipoproteins.

Differential behaviour was observed according to sex, for example, in males, soy intake produces an increase in plasma glucose, cholesterol, triglycerides and ApoA-I. While in females it is the intake of turkey that produces an increase in plasma glucose, if we compare it with the intake of casein diet, it is that one which produces an increase in plasma triglycerides, there is no apparent change in ApoA-I between the several diets. Regarding the free/esterified profile of lipoprotein-associated cholesterol, in males all the ingested proteins predispose a greater association of free cholesterol to them, while in females, the soy and casein diets have a greater association of esterified cholesterol to VLDL and LDL.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES Y ATHEROSCLEROSIS

Las enfermedades cardiovasculares, son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países occidentales con sus tres vertientes: enfermedad isquémica cardíaca, claudicación intermitente y accidente cerebrovascular (1–3). Además, es la mayor causa de muerte en los pacientes diabéticos debido a que la diabetes puede incrementar hasta cinco veces el riesgo de una enfermedad coronaria (4). La principal causa de estas enfermedades cardiovasculares es la **aterosclerosis** (5).

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico que afecta a la pared arterial, caracterizado por el engrosamiento de la capa íntima y media y pérdida de elasticidad. Su lesión básica es la placa de ateroma compuesta fundamentalmente de lípidos, tejido fibroso y células inflamatorias, y pasa por diferentes estadios (6). La acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) juega un papel clave en el inicio y progresión de la aterosclerosis. La aterosclerosis es un **proceso multifactorial** en el que están implicados tanto factores ambientales como genéticos, de entre los factores ambientales la dieta es uno de los más importantes en la progresión de la enfermedad, siendo el exceso calórico de la dieta y el frecuente desequilibrio en la ingesta de nutrientes factores determinantes en los niveles plasmáticos de lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas relacionados con la aterosclerosis (7).

#### 3.2 METABOLISMO LIPOPROTEICO

Los lípidos son necesarios para una amplia variedad de rutas metabólicas que acontecen en diferentes tejidos. Debido a su insolubilidad por su naturaleza apolar, es necesario su transporte por la sangre mediado por apolipoproteínas. Las diferentes apoproteínas (A-I, A-IV, C-II, E..., entre otras) constituyen el componente proteico de las **lipoproteínas**, formadas además por lípidos (8). Debido a que requieren estabilidad en el plasma por ser un medio acuoso, adoptan una forma subesférica; en su interior se encuentran los lípidos más apolares (triglicéridos y ésteres de colesterol) y en el exterior los menos apolares (fosfolípidos y colesterol libre). Las lipoproteínas varían en composición porcentual de lípidos y proteínas, tamaño, densidad y carga. Mediante técnicas como cromatografía líquida de filtración por gel (FPLC) se pueden separar las diferentes clases de lipoproteínas según su tamaño (4,9–11).

Los **quilomicrones** son sintetizados en el intestino y aportan los lípidos ingeridos en la dieta a los diferentes tejidos o al hígado, destacando los triglicéridos, lo que se conoce como vía exógena del transporte lipídico. En los capilares de dichos tejidos, la enzima *lipoprotein lipasa* (LPL) hidroliza los

triglicéridos para que puedan ser absorbidos en forma de ácidos grasos libres. Conforme los quilomicrones pierden lípidos, se convierten en quilomicrones remanentes, los cuales son retirados del torrente circulatorio gracias al reconocimiento de ApoE (apolipoproteína constituyente de los quilomicrones) por los receptores hepáticos (10,12).

Las **lipoproteínas de muy baja densidad** (VLDL) participan en la vía endógena del transporte lipídico, es decir, desde el hígado hacia los tejidos. Se sintetizan a partir de la captación y posterior catabolismo de los quilomicrones remanentes por el órgano hepático. Se transforman en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) al perder volumen y ganar densidad, formando posteriormente las siguientes lipoproteínas descritas, las lipoproteínas de baja densidad (10,12).

Las **lipoproteínas de baja densidad** (LDL) suministran el colesterol a las células gracias a los receptores de LDL (LDLr) que estas poseen. El reconocimiento está mediado por dos de sus apolipoproteínas constituyentes, ApoB-100 y ApoE (10,12).

Las **lipoproteínas de alta densidad** (HDL) participan en el transporte reverso del colesterol, es decir, desde los tejidos hacia el hígado, donde también son secretadas; además, evitan la oxidación de las LDL. En su síntesis son partícipes tanto el catabolismo de quilomicrones y VLDL como la formación de ApoA-I y ApoA-IV, sus principales constituyentes proteicos (ambas con capacidad anti-aterogénica). Las células periféricas suministran colesterol a las HDL nacientes, carentes de este lípido, mediante transportadores del tipo *ATP-binding cassette*. Éste es esterificado por la enzima LCAT y transportado al hígado. El colesterol HDL es transferido a las VLDL mediante la enzima CEPT, mientras que éstas les ceden triglicéridos, consiguiéndose así el reciclaje tanto de las HDL como del propio colesterol (10,12,13).

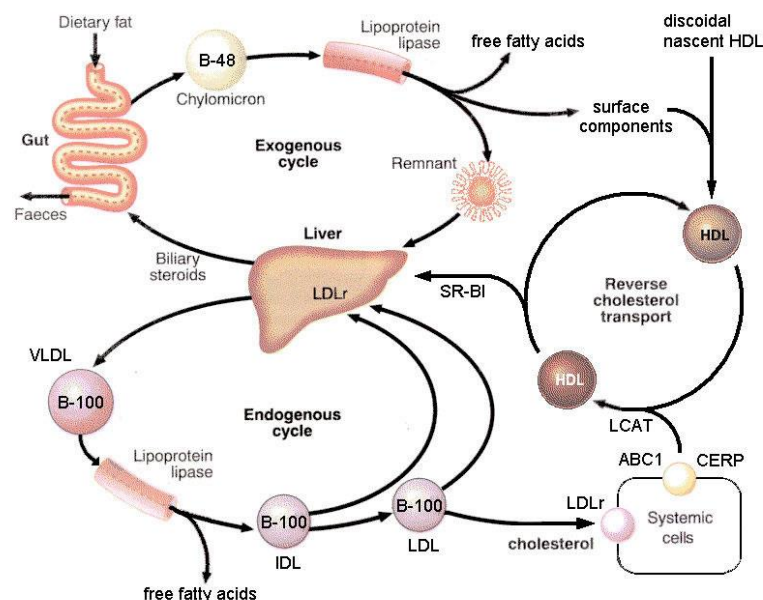


Figura 2. Esquema del metabolismo de las proteínas (13).

### 3.3 APOLIPOPROTEÍNA A-I Y HDL EN ATEROSCLEROSIS

ApoA-I es sintetizada en el intestino, y como se ha comentado anteriormente, es el principal constituyente proteico de las lipoproteínas HDL, jugando un papel crucial en el transporte reverso del

colesterol (14). Además, también participa como cofactor de LCAT en la formación de ésteres de colesterol (15).

Se ha visto que la deficiencia de dicha apolipoproteína causada por diferentes mutaciones genéticas, está relacionada con la **predisposición a padecer aterosclerosis disminuyendo el colesterol HDL**, sin embargo, el resto de lipoproteínas no se ven afectadas (15).

La modificación post-traducciona de ApoA-I puede conducir a la disfunción de HDL. Por ejemplo, en sujetos diabéticos la apolipoproteína A-I se encuentra glicosilada, lo que altera la estructura y actividad de unión a lípidos por HDL. El aumento de la carga negativa de esta apolipoproteína conlleva a una disminución de la captación de colesterol celular por las HDL. De la misma forma, la estructura de ApoA-I se ve modificada por peróxidos lipídicos, rasgo característico de aterosclerosis. Por lo tanto, un correcto funcionamiento de ApoA-I y HDL es importante para que el metabolismo lipídico transcurra con normalidad, siendo estos dos puntos un buen objetivo de diagnóstico en dicha enfermedad (14).

### 3.4 APOLIPOPROTEÍNA E

La apolipoproteína E (ApoE) se encarga del aclaramiento en el hígado de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, es decir, quilomicrones y VLDL, actuando como ligando de los receptores hepáticos, regulando la producción en dicho órgano de VLDL y su lipólisis mediante la LPL (2,16–18). Debido a su papel fundamental en el metabolismo lipídico, el estudio de la **apolipoproteína E** resulta atractivo para la aterosclerosis. Fue descubierta por Shore y cols en 1973 como el principal constituyente de las VLDL. Fundamentalmente es de síntesis hepática, participa como constituyente de quilomicrones, VLDL y HDL (2,16–18).

Esta apolipoproteína contiene dos dominios, N-terminal (residuos 1-167) donde se encuentra la unión al receptor LDL y C-terminal (residuos 206-299), el cual se encarga de la zona de unión a lípidos. Esta última interacción, también se ve mediada a través del residuo 172 (arginina), que se encuentra en la región bisagra que une ambos dominios (19,20).

Es un gen polimórfico con tres alelos co-dominantes ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ ). Según la isoforma que aparezca en los individuos, se ve comprometida su salud en cuanto al metabolismo lipídico (dislipemias), debido a que varía su afinidad por receptores o su capacidad antioxidante, entre otros factores. Además, algunos polimorfismos se han visto implicados en enfermedades neurológicas como el Alzheimer, donde ApoE participa como una chaperona patológica en la formación de placas amiloides (2,16–18).

La ausencia del gen de la apolipoproteína E en *Homo sapiens*, da lugar a **acumulación de lipoproteínas** remanentes en plasma y desarrollo de aterosclerosis. Se considera que ApoE protege frente a la aparición de la aterosclerosis debido a su función en el aclaramiento hepático y transporte reverso del colesterol. Sin embargo, la eficacia de esta protección depende la isoforma de la apolipoproteína, su nivel en plasma y el tipo celular que lleva a cabo su síntesis (21).

Existe otro tipo de efecto que justifica la aparición y progresión de aterosclerosis; como la importancia que tiene la oxidación de las LDL en la formación de la placa de ateroma. Sin embargo, la familia de la ApoE posee **actividad antioxidante** (2).

### 3.4.1 RATÓN CARENTE DE APOE COMO MODELO DE EXPERIMENTACIÓN

El empleo de modelos animales para el estudio de la aterosclerosis es necesario debido a que se desarrolla lentamente en el ser humano, lo que fomenta el análisis de factores de riesgo y prevención de la misma mediante estudios epidemiológicos (22,23).

El **ratón como modelo de experimentación animal** es ampliamente utilizado debido a que se reproduce con facilidad, dispone de razas puras y tiene un tiempo de generación corto. Además, tiene un bajo coste de mantenimiento y ocupa poco espacio. Sin embargo, este modelo es muy resistente al desarrollo de dicha enfermedad debido a que su nivel de colesterol plasmático es muy bajo y está distribuido de forma mayoritaria en las HDL. Gracias al desarrollo de la ingeniería genética se han creado modelos carentes de genes como el ratón deficiente en la apolipoproteína E (22–24).

La ausencia de ApoE impide el aclaramiento por parte del hígado de las partículas remanentes de quilomicrones y VLDL, acumulándose en el plasma y depositándose en el espacio subendotelial de las paredes arteriales. Esta es la razón por la que dicho modelo animal de experimentación desarrolla una extensa aterosclerosis fibroproliferativa espontánea que presenta la misma secuencia de formación de la lesión establecida en humanos, este hecho hace que sea un sistema atractivo para estudiar factores predisponentes, tanto ambientales como genéticos de la aterosclerosis (3).

Entre los factores ambientales, cabe destacar la dieta como uno de los más importantes. En este campo, el empleo del ratón carente de ApoE ha permitido evaluar la influencia de los distintos componentes de la dieta en la regulación del metabolismo lipídico y el desarrollo de la aterosclerosis (21).

## 3.5 PAPEL DE LAS FUENTES PROTEICAS EN EL DESARROLLO DE LA ATROSCLOEROSIS

En una dieta equilibrada, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas de la Alimentación y la Agricultura (FAO), de un 10 a un 15% de aporte calórico total debe provenir de las proteínas (9,25,26).

Los cambios en el metabolismo del colesterol y de los triglicéridos en cuanto a la modulación de la función endotelial o la adhesión de monocitos, tienen un papel importante en los efectos de dichas dietas en las lesiones de la aterosclerosis (21,27).

El aporte selectivo de aminoácidos como recurso metabólico no está muy analizado en comparación con otros macronutrientes. Estudios recientes indican que éstos pueden modificar la regulación biológica y participar en el equilibrio proteico, mantenimiento de la protostasis y en el desarrollo de enfermedades. La dieta humana que prevenga de forma eficaz la aterosclerosis aún está por definir y probar (3,28).

Existen estudios en diferentes modelos animales como conejos, cobayas o primates, que muestran que cuando la principal fuente proteica es la **soja** (29–35), los modelos animales desarrollan menos aterosclerosis. La **soja** promueve la disminución de colesterol y triglicéridos de las lipoproteínas aterogénicas (VLDL y LDL) (30,36), tiene mayores propiedades anti-aterogénicas y anti-aterotrombóticas que otras proteínas, como la **caseína**. Estas capacidades se deben a la inhibición de



la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1), lo que conlleva a una menor migración de éstos al espacio subendotelial, evitando así una de las primeras fases de la aterosclerosis (29). Además, disminuyen la síntesis de ApoB y estimulan la expresión de receptores de LDL gracias a las globulinas 7S, favoreciendo así la captación de LDL en el hígado (31).

Las dietas basadas en proteínas animales, como la **caseína**, producen un aumento de colesterol y triglicéridos en plasma junto con oxidación de lipoproteínas; todo ello se traduce en un aumento de la lesión aterosclerótica (30). Fumiki Morimatsu y cols demostraron que el hidrolizado de colágeno de **pollo** podría prevenir la aterosclerosis inhibiendo la expresión de citoquinas inflamatorias como la interleuquina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y la molécula soluble de adhesión intercelular 1 (sICAM-1), que provocan el desarrollo de la enfermedad; así como sus efectos hipolipemiantes (37).

## 4. OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto es evaluar la influencia del tipo de proteína dietética (caseína, soja, pollo y pavo) sobre algunos parámetros lipídicos relacionados con la aterosclerosis en un modelo animal de desarrollo espontáneo de aterosclerosis, como es el ratón carente de la apolipoproteína E. Para ello se deben alcanzar los siguientes objetivos:

1. Determinación de triglicéridos, glucosa, ácidos grasos no esterificados y colesterol total en plasma.
2. Separación de lipoproteínas por Cromatografía líquida de filtración por gel (FPLC). Determinación de colesterol total, libre y esterificado de las fracciones eluidas de la columna.
3. Determinación de la apolipoproteína ApoA-I en plasma mediante ELISA.
4. Análisis estadístico de los resultados obtenidos en los objetivos 1 y 3.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Los ratones se mantuvieron en el animalario del Centro de Investigación Biomédica de Aragón. Éstos, se manipularon de acuerdo a las condiciones sobre protección de animales utilizados para experimentación recogidas en el Real Decreto 53/2013. El protocolo y procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. Se emplearon 100 ratones carentes de la apolipoproteína E, 60 machos y 40 hembras, de dos meses de edad en el sustrato genético C57BL/6J, obtenidos por cruces de la colonia a partir de ratones adquiridos en el laboratorio Charles River (B6.129P2-Apo<sup>e<sup>tm</sup>1<sup>Unc</sup></sup>/J).

Con el objetivo de establecer los grupos de animales de estudio con un nivel similar de lipoproteínas basal en plasma, se tomaron muestras sanguíneas de los mismos en el ganglio maxilar tras 4h de ayuno. A partir de éstas, se determinó su nivel plasmático de colesterol total, triglicéridos y colesterol HDL y se dividieron en cuatro poblaciones por sexo.

A cada uno de los cuatro grupos experimentales de ambos sexos se les suministró durante 12 semanas una dieta rica aterogénica purificada (colesterol al 0,15% (p/p) y grasa saturada de palma al 20% (p/p) enriquecidas con un 11,2% de proteínas de soja, pavo, caseína o pollo respectivamente).

En la tabla 1 aparecen los ingredientes en g/kg de cada una de las cuatro dietas experimentales:

*Tabla 1. Composición de las dietas purificadas proporcionadas a cada grupo en experimentación.*

<b>Ingredientes (g/kg)</b>	<b>Caseína</b>	<b>Pollo</b>	<b>Soja</b>	<b>Pavo</b>
Harina de maíz	371,9	371,9	371,9	371,9
<b>Caseína</b>	111,8	-	-	-
<b>Pollo</b>	-	111,8	-	-
<b>Soja</b>	-	-	111,8	-
<b>Pavo</b>	-	-	-	111,8
Maltodextrina	123,8	123,8	123,8	123,8
Sacarosa	79,9	79,9	79,9	79,9
Aceite de soja	31,9	31,9	31,9	31,9
Celulosa	39,9	39,9	39,9	39,9
Mix minerales	27,9	27,9	27,9	27,9
Mix vitaminas	8,0	8,0	8,0	8,0
Bitartrato de colina	2,0	2,0	2,0	2,0
L-Cistina	1,4	1,4	1,4	1,4
Colesterol	1,5	1,5	1,5	1,5
Aceite de palma	200	200	200	200

Una vez las dietas fueron formuladas, se hicieron pellets, se liofilizaron y almacenaron al vacío a -20°C. Los ratones se alimentaron *ad libitum* y recibieron la nueva dieta diariamente. Además, a razón de conocer el porcentaje de ácidos grasos, colesterol y aminoácidos, se analizó una alícuota de cada dieta.

Los animales fueron sacrificados tras 12 semanas de intervención y un ayuno de 16 h a través de sofocación con CO<sub>2</sub>. Mediante esta técnica, los ratones estuvieron sujetos a condiciones de mínimo sufrimiento. La sangre se extrajo del ventrículo izquierdo con EDTA e inhibidores de proteasas. Tras su centrifugación la muestra se dividió en dos; por un lado, plasma con EDTA y por otro, suero, que se congelaron a -80°C hasta su posterior utilización para las determinaciones de parámetros plasmáticos.

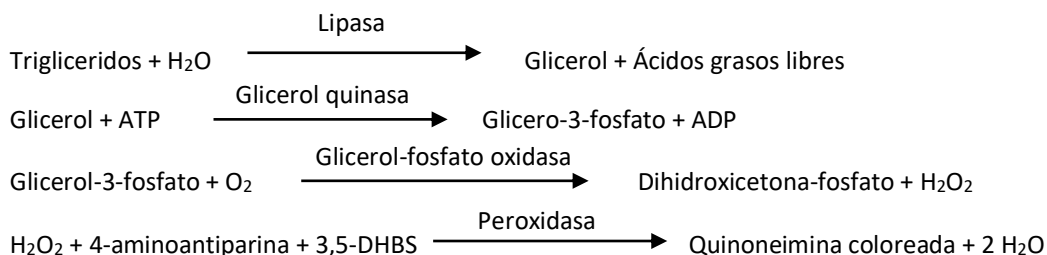
## 5.2 PARÁMETROS PLASMÁTICOS

Las determinaciones detalladas a continuación se realizaron por duplicado para cada una de las muestras de plasma.

### 5.2.1 DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS (TAG) TOTALES EN PLASMA

Los triglicéridos plasmáticos se valoraron por colorimetría con el Kit *Infinity™ Triglycerides* (Thermo Scientific). Se basa en la hidrólisis enzimática de los triglicéridos y posterior fosforilación y oxidación del glicerol liberado. Estas reacciones dan lugar a un compuesto coloreado, cuya absorbancia se mide

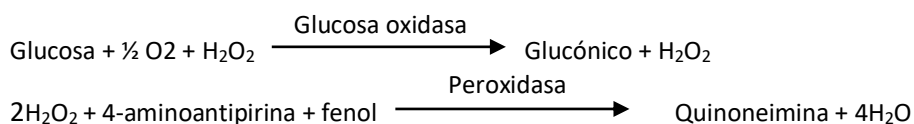
a 505 nm, la cual es proporcional a la concentración del lípido de interés presente en la muestra. A continuación, se detallan los componentes, enzimas y reactivos que se producen:



Se utilizó el lector de placas SPECTROstar Nano – BGM Labtech con un filtro de 505 nm. La determinación se realizó a partir de 2 µl/pocillo de muestra por duplicado junto con 100 µl/pocillo de reactivo, posteriormente se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Como control se utilizaron 2 µl/pocillo de agua ADDE y una recta de calibrado de glicerol (SIGMA) desde 6 mM hasta 0,19 mM.

### 5.2.2 CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA EN PLASMA

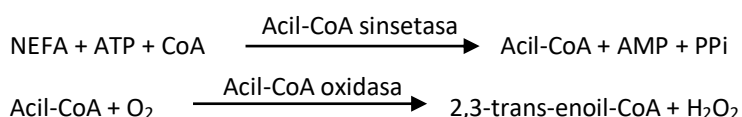
Para cuantificar la glucosa plasmática, se hizo uso del Kit *Glucosa oxidasa/peroxidasa BioSystems S.A.* Teniendo en cuenta las reacciones que se describen a continuación, cuantifica la absorbancia del compuesto coloreado (Quinoneimina) por espectrofotometría a 500 nm, la cual es proporcional a la cantidad de glucosa que hay en la muestra. A continuación, se detallan los componentes, enzimas y reactivos que se producen:

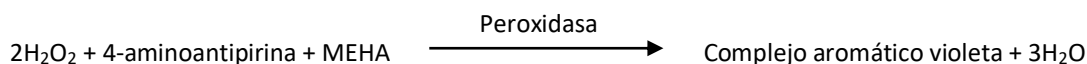


Se utilizó el lector de placas SPECTROstar Nano – BGM Labtech con un filtro de 505 nm. La determinación se realizó a partir de 2 µl/pocillo de muestra por duplicado junto con 100 µl/pocillo de reactivo, posteriormente se incubó durante 5 minutos a 37°C. Como control se utilizaron 2 µl/pocillo de agua ADDE además de 2 µl/pocillo de un patrón de glucosa proporcionado por el Kit a una concentración de 100 mg/dl para normalizar los datos.

### 5.2.3 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS (NEFA)

Para cuantificar los NEFA plasmáticos, se hizo uso del Kit *NEFA-HR (2) – ACS-ACOD Method Fujifilm*, el cual consiste en un método colorimétrico. Se cuantifica la absorbancia del complejo cromático violeta a 546 nm, la cual es proporcional a la concentración del lípido de interés presente en la muestra. A continuación, se detallan los componentes, enzimas y reactivos que se producen:

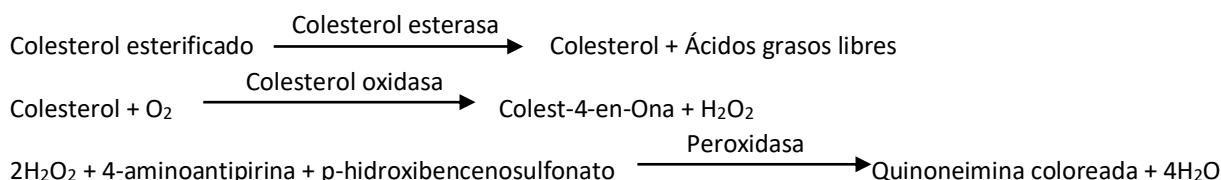




Se utilizó el lector de placas SPECTROstar Nano – BGM Labtech con un filtro de 546 nm. La determinación se realizó a partir de 2 µl/pocillo de muestra por duplicado junto con 100 µl/pocillo del “Reactivo 1”, posteriormente se incubó durante 3 minutos a 37°C y se añadieron 50 µl/pocillo del “Reactivo 2”. Como control se utilizaron 2 µl/pocillo de agua ADDE además de 2 µl/pocillo de un patrón de ácido oleico proporcionado por el Kit a una concentración de 28,57 mg/dl para normalizar los datos.

#### 5.2.4 DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL EN PLASMA

La cuantificación del colesterol total en plasma se llevó a cabo mediante el Kit colorimétrico *Infinity™ Cholesterol (Thermo Scientific)*. Se midió la absorbancia a 505 nm de la quinona coloreada que se obtiene, la cual es proporcional a la concentración del colesterol total presente en la muestra a razón de la estequiometría 1:1 de la reacción. A continuación, se detallan los componentes, enzimas y reactivos que se producen:



Se utilizó el lector de placas SPECTROstar Nano – BGM Labtech con un filtro de 505 nm. La determinación se realizó a partir de 2 µl/pocillo de muestra por duplicado junto con 100 µl/pocillo de reactivo, posteriormente se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Como control se utilizaron 2 µl/pocillo de agua ADDE, además de 2 µl/pocillo de un patrón de ácido oleico proporcionado por el Kit a una concentración de 200 mg/dl para normalizar los datos.

#### 5.2.5 SEPARACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE FILTRACIÓN POR GEL (FPLC)

##### Reactivos

- Tampón de elución de la columna PBS pH 7,4 (cloruro de sodio (NaCl, *SIGMA*) 136 mM, cloruro de potasio (KCl, *SIGMA*) 0,2 g/l, hidrógeno fosfato de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, *SIGMA*) 1,44 g/l e dihidrógeno fosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, *SIGMA*) 0,24 g/l).
- Tampón de almacenamiento PBS pH 7,4 con azida de sodio (NaN<sub>3</sub>, *SIGMA*) al 0,1%.
- Columna cromatográfica de Superose 6B (GE Healthcare).
- Equipo de FPLC (GE Healthcare).
- Colector de fracciones (GE Healthcare).
- Tubos Centricon nº 10 (Amicon Inc. Beverly, MA, USA).

## Procedimiento

La técnica FPLC sirve para separar las lipoproteínas en función de su tamaño. La matriz consiste en unas pequeñas esferas porosas formadas por un polímero entrecruzado de agarosa. El tamaño del poro determina el rango de separación óptimo, en este caso  $5 \times 10^3 - 5 \times 10^6$  de peso molecular. Las proteínas de menor tamaño quedan retenidas temporalmente, mientras que las más pesadas no pueden penetrar y son eluidas rápidamente.

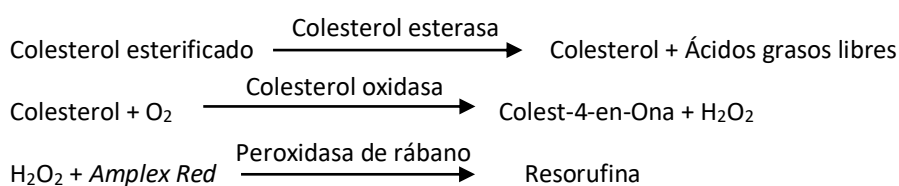
Las proteínas están compuestas por aminoácidos, los cuales absorben luz a una longitud de onda de 280 nm. La salida de éstas de la columna, es decir, su elución, se detecta mediante un espectrofotómetro. Los datos quedan registrados en un diagrama de elución, el cual indica la posición de cada una de las proteínas que se han separado.

## Análisis del perfil lipoproteico

Para realizar el análisis lipoproteico del plasma, se cargaron 100  $\mu$ l de muestra procedente de un *pool* de los animales de cada grupo (pavo, pollo, caseína y soja), tanto para machos como para hembras. El volumen de flujo de la filtración fue de 0,3 ml/min y en un colector se recogieron fracciones de 0,5 ml, rotuladas desde A10 hasta D3.

### 5.2.5.1 DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL

A partir de cada una de las fracciones lipoproteicas conseguidas por FPLC, se cuantificó el colesterol total mediante el Kit fluorimétrico *Amplex Red Reagent*. Este determina tanto el colesterol libre como el esterificado, ambos presentes en las muestras de plasma. El reactivo *Amplex Red* es una molécula no fluorescente que reacciona con el  $H_2O_2$  liberado en las reacciones generando la molécula resorufina, la cual es fluorescente en presencia de peroxidasa de rábano (HRP), según se muestra en las siguientes reacciones:



Como se puede observar, las dos primeras reacciones son iguales que las detalladas en la determinación de colesterol plasmático con el kit colorimétrico, difieren en la tercera y última. En este caso, aparece un compuesto fluorescente (resorufina) gracias a la acción de la HRP, lo que proporciona una mayor sensibilidad a dicho método.

## Procedimiento

Se añadieron 50  $\mu$ l/pocillo de los estándares de colesterol y de las fracciones, las cuales ya están diluidas en PBS al pasarlas por la columna, así como 50  $\mu$ l/pocillo de la mezcla de reacción con las enzimas y reactivo. Además, se construyó una recta patrón de colesterol en un rango de 0,3 a 20  $\mu$ M. Tras incubar las placas durante 30 minutos a 37°C, se midió la fluorescencia registrada en el lector de placas SPECTROstar OMEGA – BGM Labtech con un filtro de excitación de 550 nm y de emisión de 595 nm.

### 5.2.5.2 DETERMINACIÓN DEL COLESTEROL LIBRE Y ESTERIFICADO

Para determinar el colesterol libre presente en las fracciones de plasma recogidas del FPLC, se utilizó el mismo Kit fluorimétrico detallado en 2.4.5.1, pero en ausencia de la enzima colesterol esterasa. Gracias a esta omisión, los ésteres de colesterol permanecieron intactos y por lo tanto no fueron cuantificados. Una vez determinado el colesterol libre, mediante la diferencia del colesterol total y éste, se obtuvo el colesterol esterificado.

### 5.2.6 DETERMINACIÓN DE APOLIPOPROTEÍNAS MEDIANTE ELISA

A través del inmunoensayo ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), se detectó la señal de ApoA-I para cada grupo de ensayo de ambos sexos. Esta técnica consiste en la unión selectiva y específica de un antígeno inmovilizado (ApoA-I) y un anticuerpo primario (anti ApoA-I de ratón generada en conejo). Cuando éste último se ha fijado al antígeno, se añade otro anticuerpo conjugado con un marcador (anti IgG-I de conejo unido a fosfatasa alcalina), el cual se unirá al primario. A partir de esta unión se obtiene una señal proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra.

#### **Reactivos**

- Plasma (dilución 1/40000).
- Agua ADDE.
- PBS pH 7,4 (cloruro de sodio (NaCl, *SIGMA*) 136 mM, cloruro de potasio (KCl, *SIGMA*) 0,2 g/l, hidrógeno fosfato de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, *SIGMA*) 1,44 g/l e dihidrógeno fosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, *SIGMA*) 0,24 g/l).
- Tampón bicarbonato 0,2 M a pH 9,6 (NaHCO<sub>3</sub>, *SIGMA*).
- Tampón de dietanolamina al 10% (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>, *SIGMA*) con MgCl<sub>2</sub> (*SIGMA*) 0,5 mM (pH 9,8).
- TPBS: PBS con Tween 20 al 0,2% (pH 7,4).
- Solución de bloqueo: PBS con leche en polvo desnatada al 5% y pH 7,4.
- Anticuerpo primario (*BioDesing VII - K23001R*) a la concentración optimizada para la muestra y disuelto en TPBS (dilución 1/2000).
- Anticuerpo secundario (*SIGMA Rabbit alk-ph*) unido a fosfatasa alcalina, a la concentración optimizada para la muestra y disuelto en TPBS (dilución 1/10000).
- Solución de revelado: p-nitrofenilfosfato al 0,1% (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>6</sub>P, *SIGMA*) en tampón de dietanolamina.
- Placas de 96 pocillos de poliestireno MAXISORB.

#### **Procedimiento**

Se introdujeron 100 µl/pocillo de la muestra diluida en tampón bicarbonato en una placa de 96 pocillos; a continuación, se incubaron a 4°C toda la noche. Se eliminó la muestra no fijada por inversión de placa y se añadieron 200 µl/pocillo de la solución de bloqueo; se dejó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Posteriormente se eliminó dicha solución y se lavó tres veces con 200 µl/pocillo de TPBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 100 µl/pocillo del anticuerpo primario diluido en TPBS e incubación durante 1h 30 min a 37°C.

Tras el tiempo de espera, se realizaron tres lavados con TPBS 200  $\mu$ l/pocillo durante 5 minutos a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente se incubó con 100  $\mu$ l/pocillo de anticuerpo secundario conjugado con una fosfatasa alcalina y diluido en TPBS durante 1h a 37°C y se realizó el lavado anterior. Para revelar la muestra, se utilizaron 200  $\mu$ l/pocillo de solución de revelado dejando que se desarrollase color durante 3-4 minutos. A continuación, se utilizó el lector de placas SPECTROstar Nano – BGM Labtech con un filtro de 405 nm para medir la absorbancia recogida en cada pocillo.

### 5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se presentan como valores medios y desviaciones estándares de la media. El test de Shapiro-Wilk se aplicó para analizar el tipo de distribución. Cuando este test rechazó la hipótesis de distribución normal de la muestra o cuando el test de Barlett de homogeneidad de varianza fue significativamente diferente, las diferencias entre los grupos se calcularon por el test de Mann-Whitney no paramétrico para muestras no apareadas. En el caso contrario, las diferencias se evaluaron por test paramétrico t de Student para muestras no apareadas. Estos análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa Prism 5.00 (GraphPad Software, SanDiego, California, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

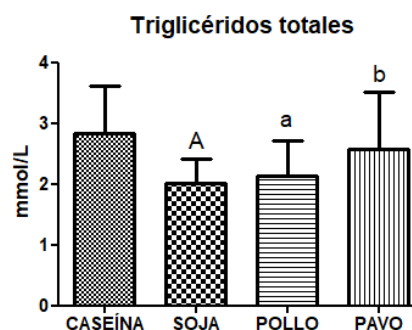
Ambos test, paramétrico y no paramétrico, comparan las medias aritméticas y cuestionan la hipótesis nula, es decir, si todas las medidas de las poblaciones son iguales. El nivel de significación  $\alpha$  fue establecido como una probabilidad inferior a 0,05 en todos los análisis estadísticos llevados a cabo. Cuando  $\alpha \leq 0,05$ , se afirma con un 95% de confianza que las diferencias entre dos poblaciones estudiadas son significativas.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 HEMBRAS

#### 6.1.1 DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS (TAG) TOTALES EN PLASMA

La concentración obtenida en mg/dl de triglicéridos totales en plasma se puede observar en la Figura 2. Los resultados se encontraron dentro de un rango de 2,014-2,827 mmol/l. Estos extremos corresponden a las hembras alimentadas con una dieta basada soja y las alimentadas con una compuesta por caseína respectivamente, cuya diferencia es muy significativa ( $p \leq 0,001$ ). Además, también cabe destacar la significatividad entre las dietas de caseína y las de pollo ( $p \leq 0,05$ ) y entre las dietas de soja y las de pavo ( $p \leq 0,05$ ). Frente a estos resultados, se puede concluir que la dieta



**Figura 2. Valores plasmáticos de triglicéridos.** Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test t de Student. a, A:  $p \leq 0,05$  ó  $p < 0,001$  vs. caseína; b, B:  $p \leq 0,05$  ó  $p < 0,001$  vs soja.

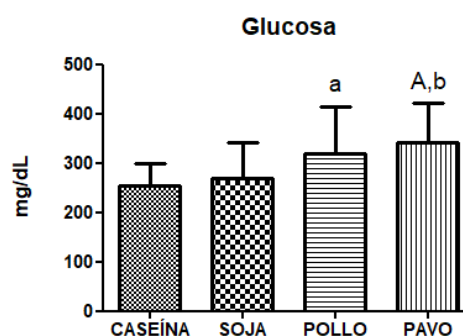
administrada a dichas hembras KO para *ApoE* puede influir en la cantidad de triglicéridos en plasma, la proteína soja hace que estos niveles sean menores, al contrario que la caseína.

Los resultados obtenidos coinciden con lo registrado en la bibliografía por otros autores, donde se observó que una dieta rica en soja provocaba la disminución de triglicéridos de las lipoproteínas aterogénicas (VLDL y LDL) si se comparaba con otras proteínas como la caseína (29,36).

### 6.1.2 CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA EN PLASMA

La concentración obtenida en mg/dl de glucosa en plasma se puede observar en la Figura 3. Las hembras KO para *ApoE* mostraron una concentración significativamente más alta de glucosa cuando fueron alimentadas con una dieta basada en pavo o con una basada en pollo frente a una dieta de caseína. Además, la dieta de pavo resultó ser significativamente mayor que la de soja ( $p \leq 0,05$ ).

Los datos bibliográficos registrados sobre el consumo de proteína animal y vegetal y su relación con los niveles de glucosa en sangre no son abundantes. Hay estudios que han observado la importancia de la fuente proteica en el manejo de la diabetes de Tipo 2 (DM2). El autor y cols observaron que, aunque la proteína no tuvo un efecto directo sobre los niveles de glucosa en sangre, la calidad de la misma podía tener importancia en el padecimiento de enfermedad cardíaca, así como en el desarrollo de diabetes Tipo 2. El aumento del consumo de carne roja, con el tiempo fue asociado con un riesgo elevado de DM2, mediado en parte por el peso corporal. Los autores observaron que, limitar este consumo de carne roja, confería beneficios para la prevención de dicha enfermedad (38). Respecto a la carne blanca, no se encuentran resultados descritos en la bibliografía, sin embargo, los resultados obtenidos en este proyecto apuntan a que consumir pollo y pavo puede afectar negativamente al desarrollo de diabetes.



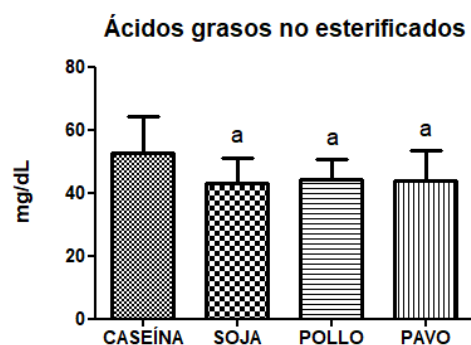
**Figura 3. Valores plasmáticos de glucosa.** Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test t de Student. a,A:  $p \leq 0,05$  ó  $p < 0,001$  vs. caseína; b, B:  $p \leq 0,05$  ó  $p < 0,001$  vs soja.

### 6.1.3 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS (NEFA)

La concentración obtenida en mg/dl de ácidos grasos no esterificados en plasma se puede observar en la Figura 4. Los animales alimentados con la dieta de caseína presentaron unos valores de dicho parámetro plasmático significativamente mayores  $p < 0,05$  que el resto de dietas proteicas, concretamente de 52,522 mg/dl.



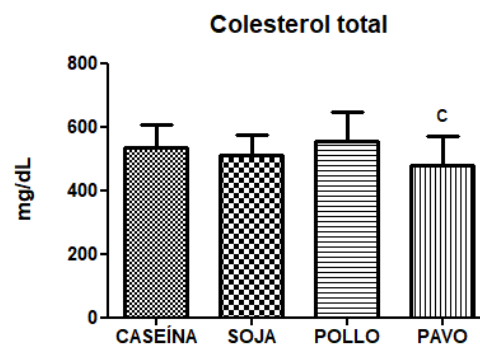
Esto podría deberse a que los animales que fueron alimentados con una dieta rica en caseína, también presentaban mayores niveles de TAG plasmáticos, favoreciendo así el incremento de ácidos grasos en el torrente circulatorio por la hidrólisis de estos TAG vía LPL. Además, en el caso de esta proteína también se obtuvieron menores niveles de glucosa, pudiéndose asociar con un cambio en la regulación del metabolismo.



**Figura 4. Valores plasmáticos de ácidos grasos no esterificados.** Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test t de Student. a,A:  $p \leq 0.05$  ó  $p < 0.001$  vs. Caseína.

#### 6.1.4 DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL EN PLASMA

La concentración obtenida en mg/dl de colesterol en plasma se puede observar en la Figura 5. En este caso, las hembras KO de *ApoE* alimentadas con dietas basadas en las cuatro proteínas de interés, mostraron una cantidad aproximada de 500 mg/dl. Se apreció una ligera diferencia ( $p \leq 0.05$ ) entre el colesterol detectado en base a la dieta proteica de pollo (553,084 mg/dl) frente al detectado en base a la dieta proteica de pavo (477,757 mg/dl). En vista de estos resultados, esta última dieta nombrada, pavo, posee menores valores plasmáticos de colesterol.



**Figura 5. Valores plasmáticos de colesterol.** Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test t de Student. c,C:  $p \leq 0.05$  ó  $p < 0.001$  vs pollo.

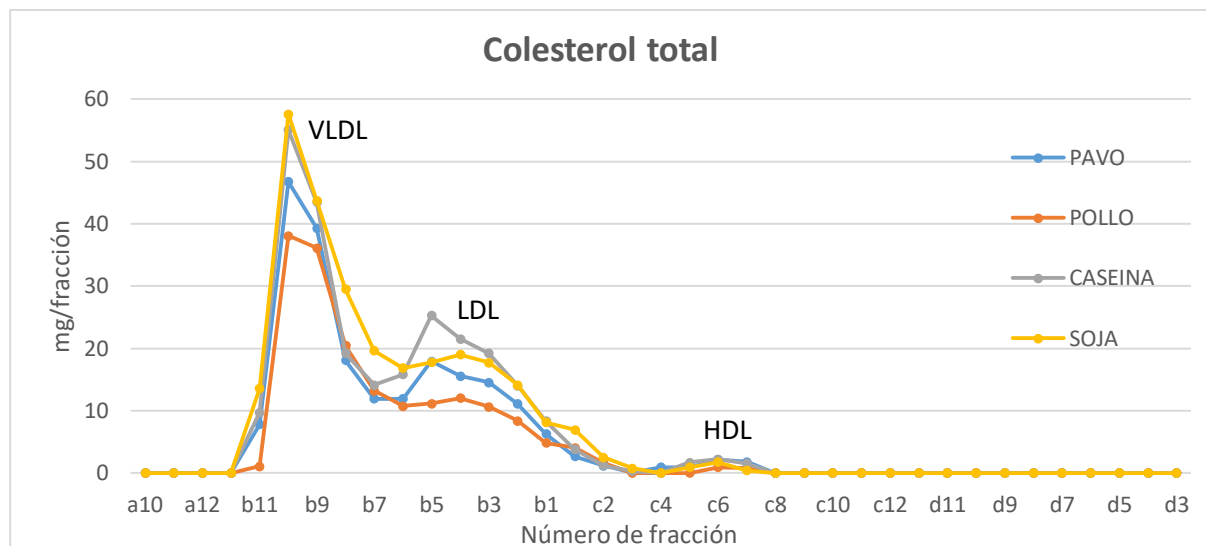
Teniendo en cuenta la bibliografía, se esperaban resultados distintos a los obtenidos, es decir, que un consumo de proteínas vegetales mostrase ligeras concentraciones plasmáticas de colesterol en comparación con proteínas de origen animal, como caseína (32,34). Se presume así que esta inconsistencia en cuanto al efecto relativo del consumo de proteína de soja sobre los valores de colesterol podría variar en función del tipo de soja utilizado en la dieta y la dieta de comparación consumida. En este proyecto se trabajó con un extracto de proteína de soja muy puro, eliminando algún componente como fibra, antioxidantes, fitosteroles, polifenoles además de otros compuestos bioactivos, los cuales ejercen efectos beneficiosos sobre los niveles de este parámetro sanguíneo.

#### 6.1.5 SEPARACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE FILTRACIÓN POR GEL (FPLC)

La técnica de FPLC como se ha comentado en el apartado 5.2.5 de Materiales y Métodos, permite separar las lipoproteínas en función del tamaño. Al estudiar los picos que se obtienen en el diagrama, se observa primero la salida de VLDL, seguida de las LDL y por último las HDL. De las fracciones

recogidas se hizo una determinación del colesterol total y del colesterol libre y esterificado obteniendo lo descrito a continuación.

#### 6.1.5.1 DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL

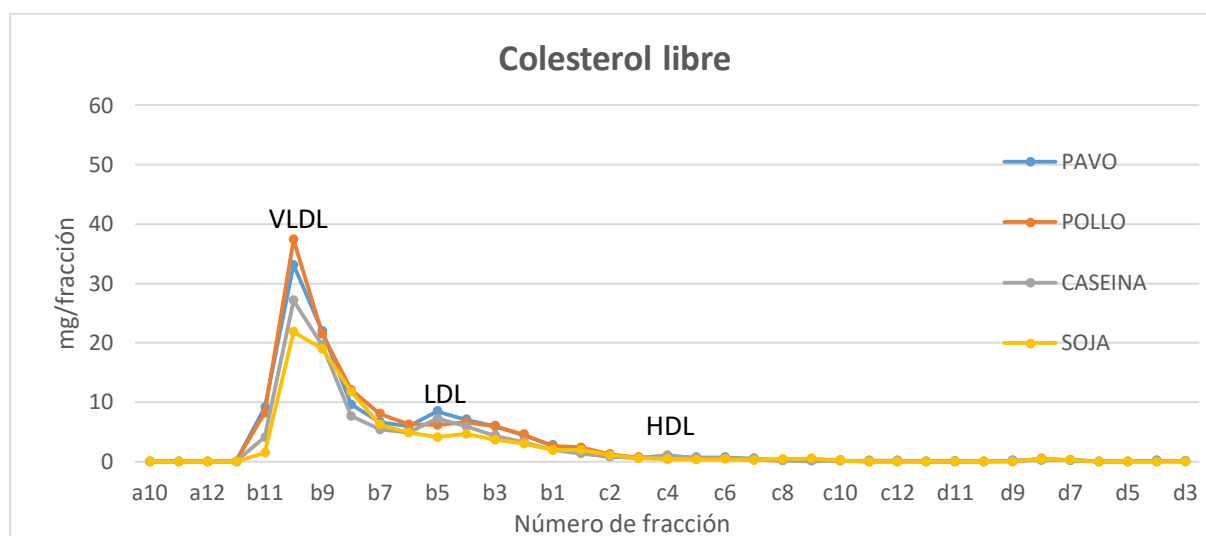


**Figura 6. Perfil de colesterol total** obtenido por el Kit Amplex Red Reagent a partir de las fracciones de FPLC de hembras KO de ApoE, según se ha comentado en el apartado 5.2.5.1 de Materiales y Métodos. La curva azul representa el colesterol obtenido a partir de la dieta de pavo, la naranja a partir de la dieta de pollo, la gris de caseína y la amarilla de soja.

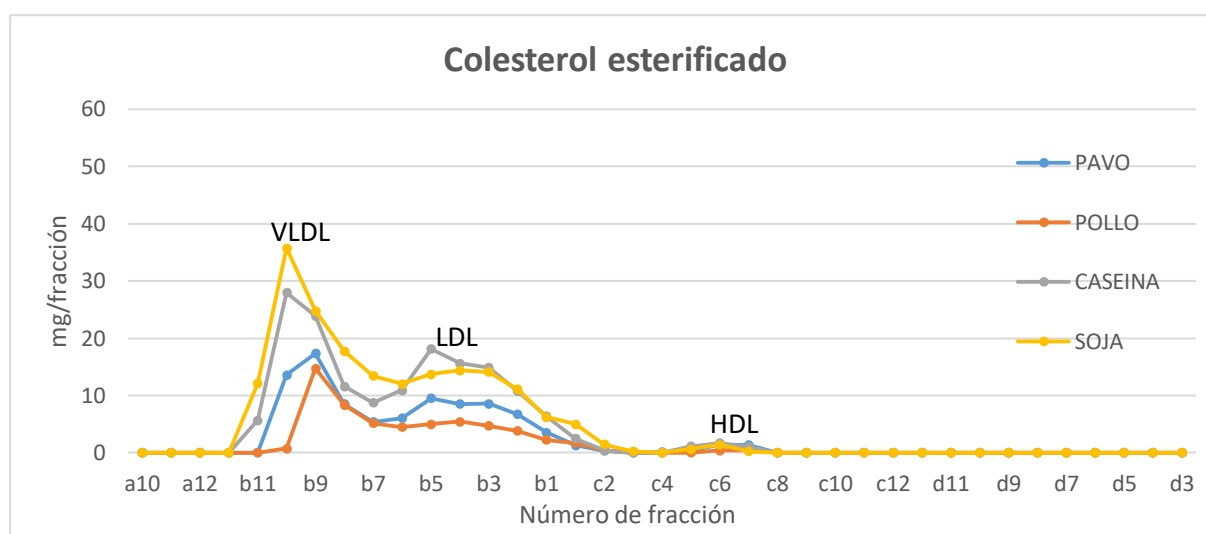
El perfil de colesterol total obtenido en mg/fracción a partir de las fracciones de FPLC se puede observar en la Figura 6. Todas las dietas se igualan en el colesterol asociado a las HDL. Sin embargo, el perfil de colesterol es el mismo, siendo las VLDL las más ricas en dicho lípido, seguidas de las LDL y por último las HDL, encontrando unos picos excesivamente marcados, como ocurre en los perfiles típicos de ratones carentes de ApoE. Esto es así porque tienen muchas VLDL y LDL acumuladas en plasma, por ello la mayor parte de colesterol plasmático se encuentra asociado a estas, al contrario que ocurre en un perfil lipoproteico de un ratón *wild-type*.

La dieta a base de soja y la propia rica en caseína, presentan una mayor cantidad de colesterol asociado a las lipoproteínas VLDL frente al resto de dieta. En el caso del colesterol asociado a las LDL, las hembras alimentadas con la dieta de caseína tuvieron niveles ligeramente superiores al resto. En la determinación de colesterol plasmático a través del método colorimétrico (6.1.4), la proteína rica en pollo fue la que mayores valores presentó, lo cual no concuerda con lo obtenido a través del análisis de colesterol de las fracciones obtenidas por FPLC. Esto puede deberse a que los datos obtenidos poseen variaciones muy ligeras entre ellos.

### 6.1.5.2 DETERMINACIÓN DEL COLESTEROL LIBRE Y ESTERIFICADO



**Figura 7. Perfil de colesterol libre** obtenido por el Kit Amplex Red Reagent a partir de las fracciones de FPLC de hembras KO de ApoE, según se ha comentado en el apartado 5.2.5.2 de Materiales y Métodos. La curva azul representa el colesterol obtenido a partir de la dieta de pavo, la naranja a partir de la dieta de pollo, la gris de caseína y la amarilla de soja.



**Figura 8. Perfil de colesterol esterificado** obtenido por el Kit Amplex Red Reagent a partir de las fracciones de FPLC de hembras KO de ApoE, según se ha comentado en el apartado 5.2.5.2 de Materiales y Métodos. La curva azul representa el colesterol obtenido a partir de la dieta de pavo, la naranja a partir de la dieta de pollo, la gris de caseína y la amarilla de soja.

El perfil de colesterol libre obtenido en mg/fracción a partir de las fracciones de FPLC se puede observar en la Figura 7. A partir de la diferencia entre el colesterol total y el colesterol libre, se obtiene el perfil del colesterol esterificado, como se muestra en la Figura 8.

Como se puede observar, la asociación del colesterol a las lipoproteínas parece variar en función de la dieta proteica. En el caso de la dieta de pollo y de la de pavo, el colesterol mayoritario que aparece en las VLDL es libre, mientras que, en el caso de las LDL, ambas formas de colesterol parecen tener una

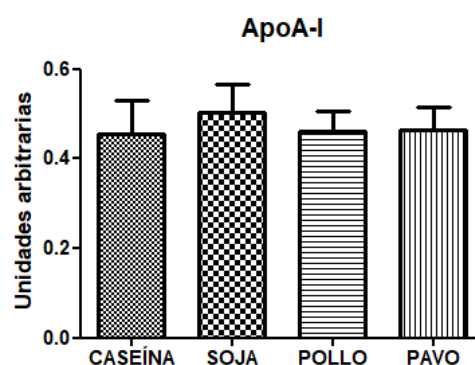
distribución similar. Para la dieta de soja y la de caseína, sucede lo contrario; en las VLDL poseen una mayor asociación de colesterol esterificado frente al colesterol libre, igual que en las LDL. En cuanto a las HDL, apenas se encuentra colesterol asociado a ellas.

Cuando el colesterol se encuentra en su forma no esterificada, es biológicamente activo y tiene efectos citotóxicos; sin embargo, cuando se encuentra esterificado constituye una forma protectora para su transporte en plasma y almacenamiento en células. Mehdil Rasoull y cols en un estudio comentan que el ratio entre ambas formas de colesterol, libre y esterificado, es un dato clave para el diagnóstico de una enfermedad vascular. El colesterol esterificado asociado a HDL y el libre asociado a VLDL y LDL suponen un factor de riesgo cardiovascular. Además, indican que pacientes que padecen este tipo de patologías, tienen un elevado colesterol total en su forma libre y una disminución de colesterol esterificado asociado a las HDL (39). Por lo tanto, el hecho de que caseína y soja tengan asociada la forma esterificada del colesterol a VLDL y LDL es un resultado esperable, puesto que en caso de ser lo contrario, constituiría un factor de riesgo cardiovascular.

#### 6.1.6 DETERMINACIÓN DE APOLIPOPROTEÍNAS MEDIANTE ELISA

La señal obtenida de ApoA-I en plasma se puede observar en la Figura 9. Estos datos parecen sugerir que ninguna dieta proteica es mejor que otra para expresar dicha apolipoproteína. Ninguna hembra KO para *ApoE* alimentada con una dieta a partir de caseína, o a partir de soja, de pollo o de pavo muestran unos niveles de ApoA-I significativamente superiores al resto.

Como ya se ha comentado anteriormente, ApoA-I es una apolipoproteína con capacidades anti-aterogénicas, por lo que se busca una sobreexpresión de esta para combatir la aterosclerosis. Además, también se ha detallado que dicha apolipoproteína era un constituyente importante de las HDL, por lo que el no obtener ningún cambio de esta lipoproteína en el FPLC concuerda con no tener cambios de ApoA-I en esta determinación.



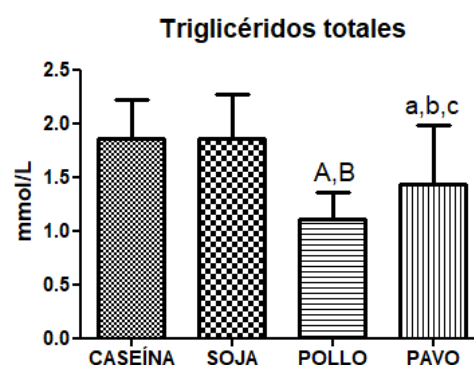
*Figura 9. Valores plasmáticos de ApoA-I. Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test t de Student.*

## 6.2 MACHOS

#### 6.2.1 DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS (TAG) TOTALES EN PLASMA

La concentración obtenida en mg/dl de triglicéridos totales en plasma se puede observar en la Figura 10. Los resultados parecen muy variados entre las distintas dietas proteicas. Cabe destacar que los machos KO de *ApoE* alimentados a base de dietas cárnicas de pavo y pollo presentaron valores significativamente menores que los alimentados con dietas de caseína y soja ( $p \leq 0,001$ ). Además, la dieta de pollo tiene una significancia menor que la de pavo.

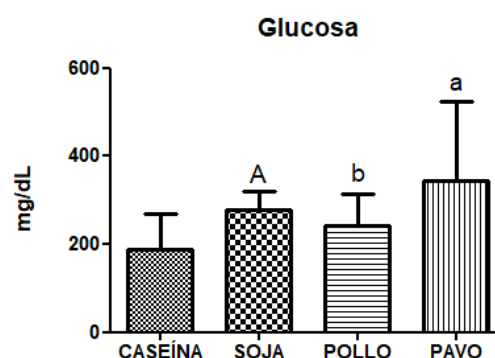
Los resultados obtenidos no coinciden con lo observado en hembras, donde una dieta basada en soja disminuía los triglicéridos plasmáticos en comparación con otras proteínas como la caseína. En cambio, en machos se observa un efecto beneficioso por parte de las dietas de carne aviar.



**Figura 10. Valores plasmáticos de triglicéridos totales.** Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test t de Student. a,A:  $p \leq 0.05$  ó  $p < 0,001$  vs. caseína; b, B:  $p \leq 0.05$  ó  $p < 0,001$  vs soja y c,C:  $p \leq 0.05$  ó  $p < 0,001$  vs pollo.

### 6.2.2 CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA EN PLASMA

La concentración obtenida en mg/dl de glucosa en plasma se puede observar en la Figura 11. Como se muestra, aparecen diferencias muy significativas entre los valores de glucosa plasmática en los machos KO para *ApoE* alimentados con una dieta de caseína y los alimentados a base de una de soja ( $p \leq 0,001$ ). A la vez cabe destacar diferencias significativas entre la proteína caseína de nuevo, frente a pollo y frente a pavo. Por lo tanto, estos resultados parecen sugerir que los machos alimentados con una dieta basada en caseína, poseen menor glucosa plasmática (187,704 mg/dl) que los alimentados con el resto de proteínas, igual que ocurría en el caso de las hembras.



**Figura 11. Valores plasmáticos de glucosa.** Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test Mann Whitney. a,A:  $p \leq 0.05$  ó  $p < 0,001$  vs. caseína; b, B:  $p \leq 0.05$  ó  $p < 0,001$  vs soja.

### 6.2.3 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS (NEFA)

La concentración obtenida en mg/dl de ácidos grasos no esterificados en plasma se puede observar en la Figura 12. Los valores más altos para dicho parámetro plasmático corresponden a los resultantes de la dieta basada en pollo; siendo significativa para caseína ( $p \leq 0,001$ ) y para soja ( $p \leq 0,05$ ). Por lo tanto, para los ácidos grasos no esterificados en el caso de los machos KO para *ApoE*, la proteína de pollo parece sugerir un aumento de los mismos frente al resto de proteínas, mientras que en el caso de las hembras este efecto se atribuía a la dieta de caseína.

Los NEFA aparecen de la movilización de los ácidos grasos desde tejidos periféricos, como adipocitos. Cuando hay menos TAG que vienen del hígado o intestino, como ocurre para el caso del pollo en machos, se intenta compensar dicha falta, de la misma forma que hay más de ambos si la glucosa plasmática está disminuida.

Además, los ácidos grasos no esterificados pueden ser liberados tanto por la hidrólisis de los quilomicrones como por la correspondiente a las VLDL; en este estudio, los animales de experimentación estuvieron en ayuno 16h, por lo que las lipoproteínas predominantes son las últimas nombradas. Por lo tanto, según los resultados obtenidos para cada sexo en este proyecto, se postula que en el caso de las hembras los NEFA compensan energéticamente la bajada glucosa mientras que en machos se trata de la compensación de la bajada de TAG.

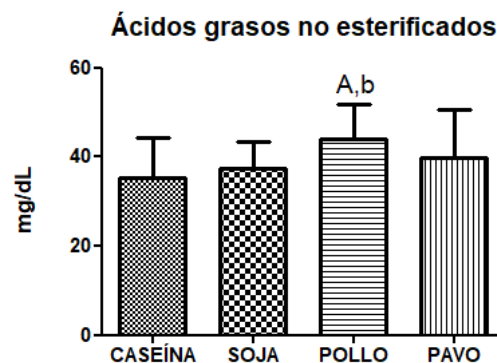
#### 6.2.4 DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL EN PLASMA

La concentración obtenida en mg/dl de colesterol en plasma se puede observar en la Figura 13. Para dicho parámetro, el valor más alto visualizado corresponde al de los machos alimentados con una dieta basada en soja. Esto, presenta una diferencia significativa frente a los datos obtenidos para los alimentados con una dieta de caseína ( $p \leq 0,001$ ).

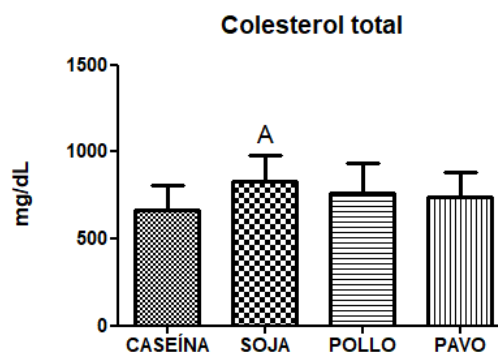
El hecho de que la soja presente un valor de colesterol mayor resulta imprevisible, igual que en el caso de las hembras, puesto que anteriormente se ha comentado que esta proteína está asociada a valores bajos de colesterol por sus propiedades detalladas. Sin embargo, como se ha descrito en el apartado 6.1.4, puede ser debido al tipo de soja utilizada en la dieta, así como la dieta de comparación administrada.

#### 6.2.5 SEPARACIÓN DE LIPOPROTEÍNAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE FILTRACIÓN POR GEL (FPLC)

La técnica de FPLC como se ha comentado en el apartado 5.2.5 de Materiales y Métodos, permite separar las lipoproteínas en función del tamaño. Al estudiar los picos que se obtienen en el diagrama, se observa primero la salida de VLDL, seguida de las LDL y por último las HDL. De las fracciones



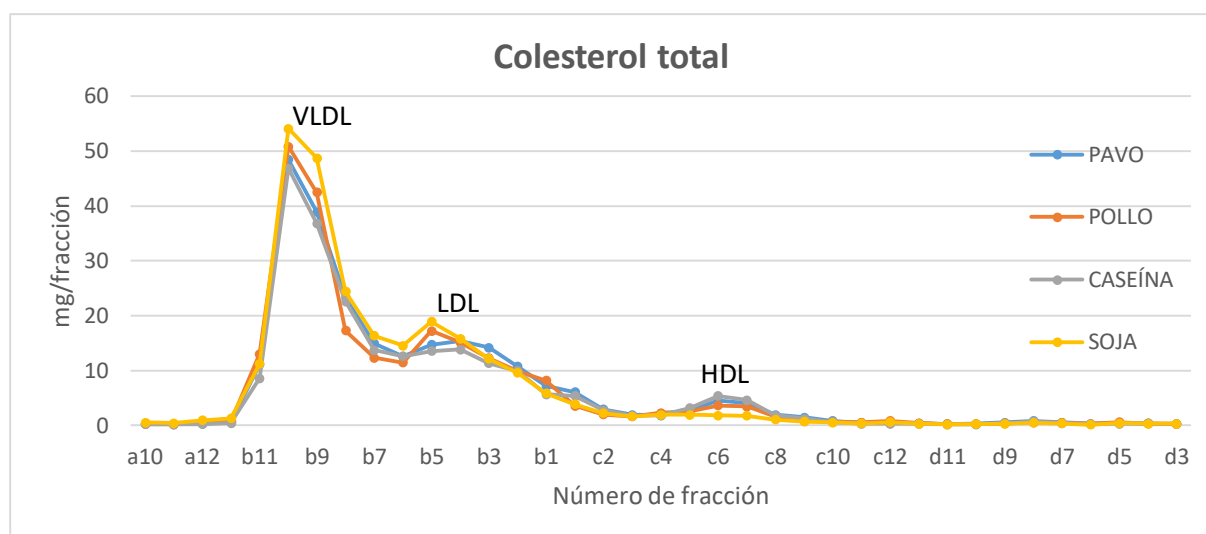
**Figura 12. Valores plasmáticos de ácidos grasos no esterificados.** Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test t de Student. a, A:  $p \leq 0.05$  ó  $p < 0,001$  vs. caseína; b, B:  $p \leq 0.05$  ó  $p < 0,001$  vs soja.



**Figura 13. Valores plasmáticos de colesterol total.** Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test Mann Whitney. a, A:  $p \leq 0.05$  ó  $p < 0,001$  vs. Caseína.

recogidas se hizo una determinación del colesterol total y del colesterol libre y esterificado obteniendo lo descrito a continuación.

#### 6.2.5.1 DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL

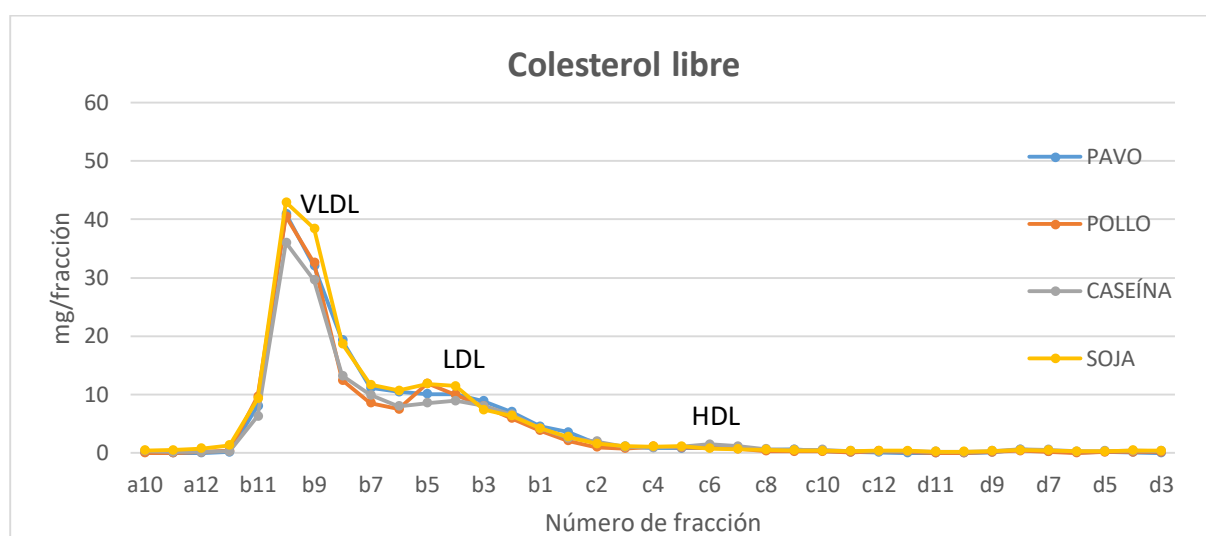


**Figura 14. Perfil de colesterol total** obtenido por el Kit Amplex Red Reagent a partir de las fracciones de FPLC de hembras KO de ApoE, según se ha comentado en el apartado 5.2.5.1 de Materiales y Métodos. La curva azul representa el colesterol obtenido a partir de la dieta de pavo, la naranja a partir de la dieta de pollo, la gris de caseína y la amarilla de soja.

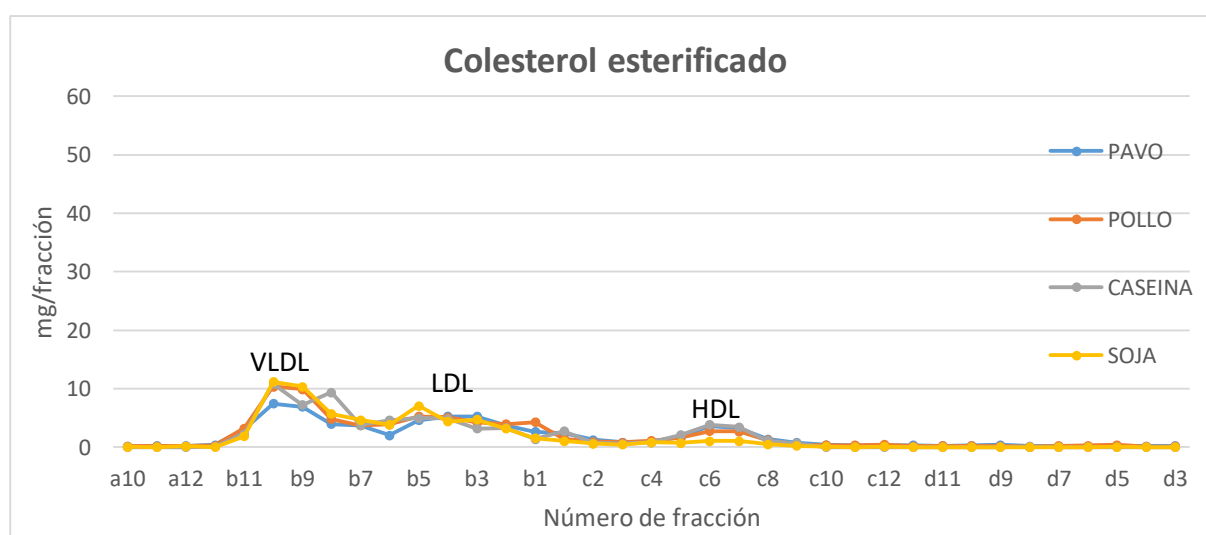
El perfil de colesterol total obtenido en mg/fracción a partir de las fracciones de FPLC se puede observar en la Figura 14. La ingesta de las cuatro proteínas experimentales presenta patrones muy similares de distribución de colesterol, típicos de los ratones ApoE KO, como se ha comentado anteriormente. Las VLDL presentan más colesterol asociado que las LDL y estas más que las HDL.

Aunque todas las dietas proteicas siguen el mismo perfil, la Figura 14 parece señalar una ligera mayor cantidad de colesterol asociado a lipoproteínas para el caso de los machos KO *ApoE* alimentados con soja para el caso de VLDL y LDL y con caseína para las HDL, lo cual coincide con lo obtenido en la determinación de colesterol plasmática por el método colorimétrico comentado en el apartado 6.2.4 Determinación de colesterol en plasma.

### 6.2.5.2 DETERMINACIÓN DEL COLESTEROL LIBRE Y ESTERIFICADO



**Figura 15. Perfil de colesterol libre** obtenido por el Kit Amplex Red Reagent a partir de las fracciones de FPLC de hembras KO de ApoE, según se ha comentado en el apartado 5.2.5.2 de Materiales y Métodos. La curva azul representa el colesterol obtenido a partir de la dieta de pavo, la naranja a partir de la dieta de pollo, la gris de caseína y la amarilla de soja.



**Figura 16. Perfil de colesterol esterificado** obtenido por el Kit Amplex Red Reagent a partir de las fracciones de FPLC de hembras KO de ApoE, según se ha comentado en el apartado 5.2.5.2 de Materiales y Métodos. La curva azul representa el colesterol obtenido a partir de la dieta de pavo, la naranja a partir de la dieta de pollo, la gris de caseína y la amarilla de soja.

El perfil de colesterol libre obtenido en mg/fracción a partir de las fracciones de FPLC se puede observar en la Figura 15. A partir de la diferencia entre el colesterol total y el colesterol libre, se obtiene el perfil del colesterol esterificado, como se muestra en la Figura 16.

Como se puede observar, en este caso, las determinaciones de este parámetro plasmático en los machos KO para ApoE a partir de cada una de las dietas proteicas parecen seguir el mismo perfil de asociación. Para todas las proteínas, el colesterol asociado a las VLDL y LDL aparece mayoritariamente de forma libre, en lugar de esterificado. En cambio, las HDL están asociadas en mayor proporción a

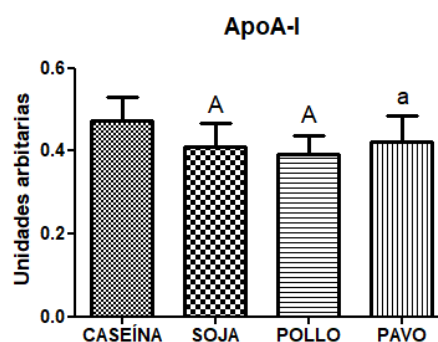


colesterol esterificado. En el caso de las hembras, las dietas de caseína y soja no seguían este patrón de asociación, es decir, poseían más colesterol esterificado asociado a VLDL y LDL, mientras que en este caso no parece haber diferencias entre las dietas.

## 6.2.6 DETERMINACIÓN DE APOLIPOPROTEÍNAS MEDIANTE ELISA

La señal obtenida de ApoA-I en plasma se puede observar en la Figura 17. Para los machos KO de *ApoE* alimentados con las distintas dietas, sí que existe relevancia en cuanto a la señal de ApoA-I obtenida, especialmente en el caso de la dieta basada en caseína. Resultaron dichos datos significativos frente a soja y pollo ( $p \leq 0,001$ ) y frente a pavo ( $p \leq 0,005$ ).

La dieta basada en caseína proporciona unos niveles más altos de ApoA-I. Dicha apolipoproteína es un constituyente importante de las HLD, por lo que participa indirectamente en el transporte reverso del colesterol, además de ser cofactor de LCAT produciendo ésteres de colesterol (14), los cuales eran favorecedores asociados a VLDL y LDL (39). Por lo tanto, podría ser interesante una dieta a base de caseína en el caso de los machos frente a la lucha contra la aterosclerosis potenciando este papel anti-aterogénico de ApoA-I.



**Figura 17. Valores plasmáticos de ApoA-I.** Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico fue llevado a cabo por el test *t* Student. a,A:  $p \leq 0,05$  ó  $p < 0,001$  vs. Caseína.

## 7. CONCLUSIONES

En función de los objetivos planteados al inicio del proyecto de fin de grado y del análisis de los resultados obtenidos, se establecen las siguientes conclusiones:

1. La ingesta de **soja y pollo** conlleva a una disminución de triglicéridos plasmáticos en comparación con la ingesta de **caseína** en las hembras ApoE KO. Sin embargo, la ingesta de **soja** produce un aumento de triglicéridos plasmáticos si lo comparamos con la ingesta de **pollo y pavo** en los machos ApoE KO.
2. La ingesta de **pavo** produce un aumento de glucosa plasmática en ambos sexos si lo comparamos con la ingesta de **caseína**.
3. La ingesta de **caseína** da lugar a un aumento de ácidos grasos no esterificados en las hembras ApoE KO; por el contrario, la dieta de pavo es la que produce ese aumento en los machos ApoE KO.
4. La ingesta de **soja** produce un aumento de colesterol plasmático frente a la ingesta de **caseína** en los machos ApoE KO.
5. La ingesta de **caseína** produce un aumento significativo de los niveles plasmáticos de ApoA-I

en los machos ApoE KO, no observándose diferencias significativas en las hembras ApoE KO alimentadas con las distintas dietas experimentales.

6. La ingesta de las cuatro dietas experimentales presenta un mismo perfil lipoproteico, aunque existe un cambio en el perfil libre/esterificado. Cabe destacar que en hembras ApoE KO, una dieta basada en proteínas de **soja y caseína** poseían más colesterol asociado a VLDL y LDL en forma esterificada, en cambio, en machos todas las proteínas ingeridas predisponen una mayor asociación de colesterol libre a dichas lipoproteínas.

## 8. CONCLUSIONS

Due to the exposed goals at the beginning of the final degree project and the analysis of the obtained results, the following conclusions can be drawn:

1. The intake of **soy** and **chicken** leads to a decrease in plasma triglycerides compared to the intake of **casein** in ApoE KO females. However, soy intake results in an increment in plasma triglycerides if it is compared to **chicken** and **turkey** intake in ApoE KO males.
2. The intake of **turkey** produces an increase in plasma glucose in both sex if it is compared to the intake of **casein**.
3. The intake of **casein** makes an increase of unesterified fatty acids in ApoE KO females; however, it is **turkey** diet which produces this increment in ApoE males.
4. The intake of **soy** generates higher levels of plasma cholesterol instead of the intake of **casein** in ApoE KO males.
5. The intake of **casein**, produces a significant increment in plasma ApoA-I levels in ApoE KO males, but no significant difference can be observed in ApoE KO females fed with the different experimental diets.
6. Although the intake of the four experimental diets present the same lipoprotein profile, there is a change in the free/esterified profile. In ApoE KO females, **soy** and **casein** diets showed more esterified cholesterol linked to VLDL and LDL. In spite of that, in males the intake of all the proteins make a higher association of free cholesterol to those lipoproteins.

## 9. REFERENCIAS

1. Arnal C. Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive. 2012;1043–57.
2. Lípidos U De, Díaz FJ. Predisposición genética a la aterosclerosis.
3. Osada Â, Joven J, Maeda N. The value of apolipoprotein E knockout mice for studying the effects of dietary fat and cholesterol on atherogenesis Jesu. 2000;25–9.
4. Gil Í, Javier P. 2014 87. 2014;

5. Hernández AG, Tortosa MCR, Aguilera MC, Mesa MD. Modelos experimentales de enfermedad cardiovascular. 2007;22(2):169–77.
6. H C Stary 1 , A B Chandler, R E Dinsmore, V Fuster, S Glagov, W Insull Jr, M E Rosenfeld, C J Schwartz, W D Wagner RWW. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. PubMed [Internet]. 1995;1512–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7670967/>
7. Meyer GRY De. Molecular and cellular mechanisms of macrophage survival in atherosclerosis. 2012;
8. Biomodel [Internet]. Available from: <http://biomodel.uah.es/model2/lip/apoproteinas.htm>
9. Agustina S, Knapik S. Caracterización y regulación nutricional de la. 2015;
10. Mahley RW, Ji Z. Remnant lipoprotein metabolism : key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. 1999;40.
11. Surra C, Ac S, Guzm MA, Sarr AJ, Arnal C, Jim A, et al. Author ' s personal copy Accelerated atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice fed Western diets containing palm oil compared with extra virgin olive oils : A role for small , dense high-density lipoproteins.
12. Errico TL, Chen X, Martin JM, Julve J, Escolà-gil JC, Blanco-vaca F. Mecanismos básicos : estructura , función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. Clínica e Investig en Arterioscler [Internet]. 2013;25(2):98–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arteri.2013.05.003>
13. Figura 1 [Internet]. Available from: [http://www3.uah.es/mapa/seminarios/activos/Biol Sanitaria/Temas 22, 23/Lipoproteinas/pages/circulacion LipoP\\_jpg.htm](http://www3.uah.es/mapa/seminarios/activos/Biol Sanitaria/Temas 22, 23/Lipoproteinas/pages/circulacion LipoP_jpg.htm)
14. Smith JD, Smith JD. Dysfunctional HDL as a Diagnostic and Therapeutic Target. 2010;
15. Williamson R, Lee D, Hagaman J, Maedat N. Marked reduction of high density lipoprotein cholesterol in mice genetically modified to lack apolipoprotein A-I. 1992;89(August):7134–8.
16. The UniProt Consortium [Internet]. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/P02649>
17. C AMG. La apolipoproteína E : el polimorfismo genético y su relación con los cambios metabólicos , los hábitos alimenticios y el origen étnico. 2003;10(4):189–93.
18. Rall SC, Weisgraber KH, Mahley W. Human E. 1982;257(8).
19. Opinión LA, Experto DEL. La opinión del experto. 2006;54(1):53–66.
20. Biomodel [Internet]. Available from: <http://biomodel.uah.es/model2/lip/apo-e.htm>
21. Pari MA, Paul A, Vilella E, Joven J, Jime A, Beltra G, et al. Low-Cholesterol and High-Fat Diets Reduce Atherosclerotic Lesion Development in ApoE-Knockout Mice. 1999;2368–75.
22. Navarro MA, Arbonés JM, Acín S, Carnicer R, Sarría AJ, Surra JC, et al. Animales de experimentación utilizados como modelos en la investigación de la arteriosclerosis. 2005;17(2):82–93.
23. Santos-gallego CG, Badimon JJ, Ibáñez B. Modelos experimentales de aterosclerosis. 2013;13(Cml):3–12.
24. Joven APJ. El ratón deficiente en apolipoproteína E y su aplicación al estudio de la arteriosclerosis. Clínica e Investig en Arterioscler [Internet]. 13(4):162–6. Available from:

[http://dx.doi.org/10.1016/S0214-9168\(01\)78791-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0214-9168(01)78791-8)

25. Organización Mundial de la Salud (OMS) [Internet]. Available from: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr32/es/>
26. Clifton PM, Keogh J. Metabolic Effects of High-protein Diets. 2007;
27. Ferré N, Camps J, Paul A, Cabré M, Calleja L, Osada J, et al. Effects of high-fat , low-cholesterol diets on hepatic lipid peroxidation and antioxidants in apolipoprotein E-deficient mice. 2015;(March 2001).
28. Wolfson RL, Sabatini DM. HHS Public Access. 2018;26(2):301–9.
29. Expression P-, Nagarajan S, Burris RL, Stewart BW, Wilkerson JE, Badger TM. Dietary Soy Protein Isolate Ameliorates Atherosclerotic Lesions in Apolipoprotein E-Deficient Mice Potentially by Inhibiting Monocyte Chemoattractant. 2008;(September 2007):8–13.
30. Paper O. Casein and Soy Protein Isolate in Experimental Atherosclerosis : Influence on Hyperlipidemia and Lipoprotein Oxidation Na. 2001;38–46.
31. Adams MR, Golden DL, Anthony MS, Register TC, Williams JK, Al AET. Nutrient-Gene Expression The Inhibitory Effect of Soy Protein Isolate on Atherosclerosis in Mice Does Not Require the Presence of LDL Receptors or Alteration of Plasma Lipoproteins 1. 2002;(October 2001):43–9.
32. Cos E, Ramjiganesh T, Roy S, Yoganathan S, Nicolosi RJ, Luz M. Soluble Fiber and Soybean Protein Reduce Atherosclerotic Lesions in Guinea Pigs . Sex and Hormonal Status Determine Lesion Extension. 2001;36(11).
33. Adams MR, Golden DL, Williams JK, Franke AA, Register TC, Kaplan JR. Soy Protein Containing Isoflavones Reduces the Size of Atherosclerotic Plaques without Affecting Coronary Artery Reactivity in Adult Male Monkeys 1 , 2. 2005;(September):2852–6.
34. Lo GS, Evans RH, Phillips KS, Dahlgren RR. Effect of soy fiber and soy protein on cholesterol metabolism and atherosclerosis in rabbits. 1987;64:47–54.
35. Ni W, Tsuda Y, Sakono M, Imaizumi K. Biochemical and Molecular Roles of Nutrients Dietary Soy Protein Isolate , Compared with Casein , Reduces Atherosclerotic Lesion Area in Apolipoprotein E – Deficient Mice 1 , 2. 1998;(July):1884–9.
36. Sawashita N, Sc M, Naemura A, Sc B, Shimizu M, Sc M, et al. Effect of dietary vegetable and animal proteins on atherothrombosis in mice. 2006;22:661–7.
37. Vitaminol JNS. Production in C57BL / 6 . KOR-ApoE shl Mice. 2010;6:208–10.
38. Commentary SI. Changes in Red Meat Consumption and Subsequent Risk of Type 2 Diabetes Mellitus. 2013;
39. Bagheri B, Alikhani A, Mokhtari H, Rasouli M. The Ratio of Unesterified / esterified Cholesterol is the Major Determinant of Atherogenicity of Lipoprotein Fractions. 2018;72(2):103–7.